

I
660.62
M17

**“Microorganismos anaerobios ruminales de
ganado criollo bon: Identificación molecular y
evaluación de su capacidad celulolítica”**

Presentado por la profesora de la Escuela de Biociencias
Edna Judith Márquez Fernández

Promoción a Profesora Asociada



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE MEDALLÍN

DEPTO. DE BIBLIOTECAS
BIBLIOTECA “EFE” GÓMEZ

Escuela de Biociencias
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia
Medellín

UNAL - Medellín



64001000051804

I
660.62
M17



INTRODUCCIÓN

La investigación biotecnológica esta dedicada a maximizar toda la eficiencia de cada una de las etapas del proceso biotecnológico y encontrar organismos que sinteticen productos que sean útiles a nivel industrial, alimenticio, ambiental y farmacéutico. Este ultimo proceso involucra necesariamente el aislamiento, caracterización y si es preciso, modificación de genes que se expresen efectivamente en microorganismos que puedan ser usados para la producción industrial.

Con el fin de contribuir a la búsqueda de enzimas celulolíticas de uso potencial en procesos biotecnológicos agroindustriales, en el presente trabajo se compilaron los resultados aún no publicados de tres proyectos de investigación desarrollados bajo mi dirección, los cuales están orientados a la identificación de aislamientos nativos de bacterias y hongos anaerobios del rumen de ganado criollo BON y a la evaluación de su capacidad enzimática en residuos de cosecha.

Esta compilación permitió visualizar y discutir los resultados de una manera global, que no era posible realizar previamente por la diferencia temporal en el desarrollo de estos trabajos (2000 – 2005). Los resultados alcanzados contribuyen a generar conocimiento y estandarizar metodologías para el estudio de microorganismos ruminales aislados de ganado criollo colombiano, una de las áreas poco exploradas en nuestro país y en el mundo.

En la primera sección se presentan los trabajos realizados con bacterias anaerobias ruminales, los cuales se concentraron en la identificación

molecular por técnicas de PCR y secuenciación. En la segunda se presentan los trabajos realizados en hongos anaerobios ruminales, en los cuales se hizo una aproximación a su identificación molecular y la evaluación de su capacidad celulolítica en residuos de cosecha. Una sección final está concentrada en condensar los alcances y perspectivas en este campo de investigación.

En Colombia, esta área de investigación viene siendo abordada por muy pocos grupos de investigación. De hecho, a finales del año 1999, en Colombia solo dos grupos de investigación trabajaban microorganismos ruminales con un enfoque principal en la nutrición animal: CORPOICA y el Grupo de Biotecnología Ruminal, BIORUM de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Solo recientemente, un grupo de la Universidad de Antioquia se ha sumado a la investigación en esta área.

Por invitación del profesor Luis Alfonso Giraldo, director del Grupo BIORUM inicié mi participación en el grupo, con el interés centrado en la diversidad genética microbiana del rumen. Sin embargo, el grupo BIORUM apenas estaba tratando de implementar el cultivo y recuento de microorganismos ruminales y no contaba con el desarrollo investigativo ni la infraestructura adecuada para que se pudiera adelantar la investigación en ese sentido. El carácter anaeróbico y pleomórfico de la microbiota ruminal había creado la necesidad implementar técnicas moleculares para su recuento pero La Sede no contaba con equipos que permitieran cuantificar las hibridaciones marcadas radiactivamente que se usaban para estos fines.

Esta limitación fue la motivación principal para el desarrollo de una técnica molecular basada en PCR en el que las cortas sondas especie específicas y

universales utilizadas para el recuento por métodos de hibridación podrían ser cebadores. Esta idea dio origen al proyecto “Identificación de bacterias anaerobias del rumen (BAR) mediante la reacción en cadena de la polimerasa” y en el realizaron sus trabajos de grado los estudiantes de Zootecnia José Carlos Menco González y Juan Aicardo Segura Caro, los cuales fueron distinguidos como *meritorios* y la estudiante de Maestría en Biotecnología, Diana Patricia Gómez Cortés. En los proyectos “Hongos Anaerobios del Rumen: Identificación molecular y evaluación de su capacidad celulolítica” y “Producción de celulasas a partir de cepas nativas de hongos anaerobios cultivados en residuos de cosecha” participaron los estudiantes de la Maestría en Biotecnología Edgar de Jesús Múnera Tuberquia y en forma parcial, Diana Patricia Gómez Cortés.

Los resultados alcanzados, se obtuvieron con recursos limitados y una infraestructura inadecuada, pero con el entusiasmo de los que hemos tenido la oportunidad de trabajar en estos proyectos. En el Laboratorio de Biotecnología Ruminal por ejemplo, no se cuenta con una cámara de anaerobiosis sino con adaptaciones simples que permiten el flujo de gases desde la pipeta de CO₂ a los medios de cultivo. Otras adaptaciones tales como convertir la punta de una pipeta Pasteur en ventosa, diseñar un micropistilo acoplado a un taladro para fracturar micelio en tubos eppendorf y el diseño y elaboración en acrílico de una cámara de anaerobiosis son algunos de las evidencias creativas de los estudiantes que aceptaron el reto de transitar conmigo por el mundo poco explorado de la microbiota ruminal del trópico.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS ANAEROBIAS RUMINALES DE GANADO CRIOLLO BON.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias anaerobias ruminales, constituyen uno de los grupos más abundantes en la masa microbiana ruminal (80%) y juegan un papel importante en la nutrición de los rumiantes debido a que su amplio espectro de acción enzimática, la cual contribuye a la degradación de alimentos con altos contenidos de pared celular y baja digestibilidad (Stewart, 1991; Yokoyama y Johnson, 1993).

Las bacterias anaerobias ruminales exhiben un marcado pleomorfismo en cultivos *in vitro* (Rodríguez et al. 1996) y algunas especies presentan similitudes en su perfil bioquímico (Hungate 1950, 1966; Montgomery and Macy, 1982). Esta situación, sumada a la subjetividad implícita en la interpretación de las pruebas (Drancourt, et al, 2000; Head, et al, 1998) conduce a imprecisiones en la identificación morfológica y bioquímica de estas especies (Ranade y Grade 1988), por lo tanto ha estimulado la búsqueda de secuencias diagnósticas que permitan identificarlas de manera más apropiada.

Los métodos de hibridación de ácidos nucleicos utilizando sondas oligonucleotídicas que detectan ARNr 16S se han utilizado exitosamente para la identificación y cinética proliferativa en cultivos puros y mezclados en las tres principales bacterias celulolíticas *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes* o directamente en contenido del tracto gastrointestinal de diferentes organismos rumiantes (Makie, 1996; Ludwig, et al, 1994; DeLong, et al, 1989; Lin y Sthal, 1995; Schofield, et al,

1997; Jullian, et al 1999, Briesacher, et al, 1992; Schofield, et al, 1997) y no rumiantes (Jullian, et al 1999; Lin y Sthal, 1995),

A pesar de su utilidad, las pruebas de hibridación resultan dispendiosas y consumen relativamente mucho tiempo, razón por la cual se han desarrollado métodos diagnósticos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Por medio de esta técnica se ha determinado la identidad de algunas especies de bacterias anaerobias ruminales amplificando regiones de los genes que codifican Xilanasas A o Endoglucanasas A para *Ruminococcus flavefaciens* (Wang and Cerniglia, 1997, Ossa et al., 1999) y Endoglucanasa B para *F. succinogenes* (Ossa, et al, 1999). Sin embargo, se ha demostrado que estas endoglucanasas se transmiten vía horizontal a otras bacterias ruminales (Amann et al, 1992; Morrison, 1996), hongos (Denman et al, 1996; Vallve et al, 2000) y protozoos (Gilbert et al, 1992; Devillard et al, 1999), lo cual descartaría su carácter especie específico.

En el caso particular de *Ruminococcus albus*, se diseñó un par de cebadores a partir de las secuencias de la región 16S del DNA ribosomal, ADN_r 16S (Wang and Cerniglia, 1997) y más recientemente se diseñaron cebadores específicos de la misma región para *F. succinogenes* y *R. flavefaciens*, con base en la información publicada en las bases de datos (Koike y Kobayashi, 2001). Sin embargo, no es claro si estas secuencias son útiles para identificar bacterias provenientes de ganados criollos colombianos debido al escaso número de secuencias de ADN_r en las bases de datos y a la ausencia de secuencias publicadas que representen la diversidad genética de las especies microbianas que habitan el ganado criollo colombiano.

Con el fin de generar información útil en la identificación de bacterias anaerobias ruminales y contribuir al conocimiento de la microbiota nativa

ruminal del trópico, en el presente trabajo, se utilizaron como cebadores sondas oligonucleotídicas previamente reportadas (Aman, et al, 1990; Briesacher et al., 1992 y Odenyo et al., 1994) para identificar por PCR, las principales bacterias anaerobias celulolíticas y se secuenciaron las regiones ADNr 16S de 19 aislamientos nativos del rumen de ganado criollo Blanco Orejinegro, BON.

METODOLOGÍA

Cepas de referencia

Se utilizaron las cepas de referencia de *F. succinogenes* GC5 (ATCC 51216), *R. albus* R93-12 (ATCC 27210) y *R. flavefaciens* R93-68 (ATCC 19208) de la casa comercial *American Type Culture Collection* (ATCC). Estas cepas fueron revitalizadas y cultivadas teniendo en cuenta las recomendaciones del proveedor. Para el caso de *Ruminococcus*, la temperatura de incubación fue de 39°C en lugar de 37°C. El crecimiento bacteriano se monitoreó por inspección visual de la turbidez del medio de cultivo, se realizó tinción Gram modificado de Kopeloeff (Pezzlo, 1995) y se cultivaron diluciones de 10^{-7} a 10^{-9} en medio sólido durante 72 horas a 39°C, para constatar su morfología en el agar.

Cultivos bacterianos nativos examinados.

Se utilizaron 43 cultivos bacterianos nativos aislados del rumen de dos bovinos de 450kg de la raza Criollo Blanco Orejinegro (BON), alimentados con pasto Pará (*Brachiaria mítica*) y gramas nativas. Con base en características microscópicas y tintoriales, 18 de estos aislamientos fueron seleccionados para su identificación con cebadores específicos de *F. succinogenes* y 15 con cebadores específicos de *R. albus* y *R. flavefaciens*.

Para confirmar la especificidad de los cebadores utilizados, 19 aislamientos fueron secuenciados en la región ADN_r 16S.

El aislamiento y cultivo de las bacterias se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Hungate, 1966 y Bryan, 1972, con pocas modificaciones. Los medios de dilución y crecimiento, contenían 15 ml de solución salina I (K₂HPO₄, 3.0 g por litro de agua destilada); 15ml de solución salina II (KH₂PO₄, 3g; CaCl₂·2H₂O, 0.79g; NaCl, 6g; SO₄(NH₄)₂, 6g; MgSO₄·7H₂O, 1.23g; agua destilada, 1.0 lt); 40 ml de fluido ruminal clarificado; 0.25 g de Extracto de levadura; 0.1 g celobiosa; 0.6 g de NaHCO₃; y 45 ml de agua destilada, el pH final de medio fue de 7.0 (± 0.2). Después de 72 horas de incubación, se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas de las colonias bajo tinción de Gram modificada por Kopeloff (Pezzlo, 1995), se seleccionaron colonias Gram negativas y Gram positivas, se transfirieron a medio líquido, se incubaron a 39°C por 48 horas y se purificaron con pases sucesivos.

Reacciones de amplificación:

El DNA se aisló a partir de cultivos bacterianos de 48-72 horas de incubación, utilizando el kit comercial Wizard® Genomic DNA purification Kit A1120 (Promega, Madison U.S.A.) según las recomendaciones del fabricante. Las sondas oligonucleotídicas especie específicas previamente evaluadas y validadas para análisis de la dinámica ruminal en otras razas de bovinos (Odenyo et al. 1994 y Briesacher, et al, 1992, Aman, et al, 1990), se utilizaron como cebadores para amplificar parcialmente las regiones ADN_r 16S. Los cebadores especie específicos *forward* fueron 5'-TGC CCG CCA CTC ATG TTC CGG-3' para *F. succinogenes*, 5'-ATA ACG AAG CCG CAT ✱

GAC-3' para *R. albus* y 5'-CTA AAG GGA CTG CCG TT-3' para *R. flavefaciens*. En todos los casos se utilizó como cebador reverso la sonda universal 5'-ACG GGC GGT GTG TAC AAG GCC-3'.

Para *F. succinogenes*, las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de reacción en 25 µl que contenían 2.5 µl de Buffer 10X, 0.625 U de Taq polimerasa marca Promega®, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada uno de los desoxirribonucleótidos, 1.0 µM de cada uno de los cebadores. Para *R. albus* y *R. flavefaciens*, se utilizaron mezclas de reacción similares excepto porque en este caso se empleó una concentración de 0.2 µM para cada uno de los cebadores.

La amplificación de los segmentos específicos de *F. succinogenes*, se realizó teniendo en cuenta las condiciones de amplificación de Koike y Kobayashi, 2001. En el caso de especies del género *Ruminococcus*, se diseñó un perfil térmico para cada una de las especies teniendo en cuenta la metodología descrita por Rolfs *et al.*, 1992. Los perfiles térmicos para la PCR de las tres especies bacterianas, se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Perfil térmico para PCR en las especies *F. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens*.

Etapas	<i>F. succinogenes</i>			<i>R. albus</i>			<i>R. flavefaciens</i>		
	Ciclos	T°C	T	Ciclos	T°C	T	Ciclos	T°C	t
Denaturac. inicial	1	95	1 min	1	95	3 min	1	95	3 min
Denaturación	48	94	30 seg	30	95	30 seg	30	95	30 seg
Alineamiento		60	30 seg		65	1 min		60	1 min
Extensión		72	30 seg		72	30 seg		72	30 seg
Final	1	72	5 min	1	72	5 min	1	72	5 min

Las reacciones de amplificación se realizaron en termociclador T3 marca Biometra®. Los fragmentos obtenidos por PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, buffer TBE 0.5X, se corrieron por 55 minutos a 90 voltios, se tiñeron con Bromuro de Etidio al 0.1% y se visualizaron y fotografiaron en el equipo BioDocAnalyze marca Biometra®. Se usó un marcador de peso molecular de 100 pb con un rango de 100 a 1500 pb de Promega®.

Secuenciación de ADN 16S

El DNA obtenido de 19 cultivos bacterianos nativos fue enviado directamente a la compañía Macrogen en Korea Japón, quienes utilizaron los cebadores universales 27f 5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' y 1492r 5'- TAC GYT ACC TTG TTA GGA CT-3' para secuenciar los extremos de los fragmentos en los dos sentidos de la doble cadena. Basados en la información derivada de los extremos de las secuencias preliminares, se diseñaron los cebadores internos *forward*: 5'-GTG TRA GCG GTG AAA TGC G-3' y *reverso*: 5'-GCT TGT GCG GGC CCC CG-3', ubicados respectivamente en las posiciones 693-710 y 570-587, para obtener las secuencias de la longitud completa del fragmento ADNr 16S flanqueado por los cebadores universales.

La edición de las secuencias se realizó utilizando el programa Seqman V 3.0.3 (9889-1995, DNASTAR Inc) y por inspección visual de los cromatogramas obtenidos. La alineación de las secuencias se realizó con el programa ClustalW, versión 1.6 incluido en el paquete informático BioEdit 6.0.5.2 1997® - 2004® (Hall, 1999). Para la identificación molecular de los aislados nativos, las secuencias editadas fueron analizadas teniendo en cuenta los criterios descritos por Drancourt *et al.*, 2000. El porcentaje de

similitud con secuencias de las bases de datos primarias GenBank, EMBL y DBJ se calculó mediante el programa BLAST, versión 2.29 de 2004 (Altschul et al., 1990). Las relaciones filogenéticas se estimaron mediante el cálculo de la distancia genética Kimura de 2 parámetros entre los aislados nativos y las secuencias en las bases de datos que mostraron gran similitud sin considerar los *Gaps*. Con esta información se construyó un dendograma utilizando el método de agrupamiento Neighbour joining con *bootstrap* de 1000 repeticiones y la ayuda del programa MEGA 2.1 (1993[®]). Para especies con secuencias diagnósticas previamente reportadas, se detectó la presencia de dichas secuencias *in silico* en la región ADNr 16S.

RESULTADOS.

Características macroscópicas y microscópicas de las cepas nativas:

Las colonias de los aislados obtenidos en medio sólido, presentaron diversas formas que se resumen en la tabla 2 y en las figuras 1 - 3. A nivel microscópico, el grupo seleccionado como presuntas *F. succinogenes* presentaron un comportamiento Gram variable (Figura 2^c) y un marcado pleomorfismo en medio líquido: bacilos cortos y cocobacilos Gram negativos a las 6 horas (Figura 2^a), predominio de cocobacilos cortos a las 12 y 24 horas (Figura 2^b), cocobacilos en degeneración y algunos cocobacilos en forma de limón a las 48 horas (Figura 2^c). Este comportamiento concuerda con lo reportado por Montgomery et al, 1988 y Rodríguez et al, 1996 para la especie *F. succinogenes*.

Tabla 2. Características morfológicas de los aislados nativos seleccionados

CEPA	TINCIÓN DE GRAM	MORFOLOGIA MICROSCOPICA	MORFOLOGIA MACROSCOPICA
1*	Gram negativos	Bacilos rectos	Colonias elipsoidal
2*	Gram negativos	Cocobacilos	Colonia irregular
3	Gram negativos	Cocobacilos cortos	Colonia elipsoidal
4*	Gram negativos	Cocobacilos	Colonia irregular
5	Gram variables	Bacilos cortos	Colonia irregular
6*	Gram negativos	Cocobacilos	Colonia lenticular
7*	Gram positivos	Bacilos largos	Colonia irregular
8	Gram negativos	Bacilos largos	Colonia irregular
9*	Gram positivos	Cocos	Colonia con 3 lentes
10	Gram positivos	Cocos	Colonia con elevación central
11*	Gram positivos	Estreptococos	Colonia con halo
12	Gram positivos	Estreptococos y diplococos	Colonia con halo
13	Gram positivos	Cocos	Colonia con 4 lentes
14	Gram positivos	Micrococos en díadas	Colonia irregular con halo
15	Gram positivos	Estreptococos y tétradas	Colonia pequeña con borde regular
16	Gram positivos	Micrococos en cadena	Colonia multilenticular
17*	Gram positivos	Estreptococos	Colonia con 3 lentes
18	Gram positivos	Estreptococos	Colonia grande con borde regular
19	Gram positivos	Cocos	Colonia triangular
20*	Gram positivos	Micrococos en cadena	Colonia multilenticular
21	Gram positivos	Cocos	Colonia con 3 lentes
22*	Gram positivos	Bacilos largos	Colonia irregular
23	Gram positivos	Micrococos en cadena	Colonia multilenticular
24	Gram positivos	Bacilos largos	Colonia irregular
25	Gram negativos	Bacilos largos	Colonia irregular
26	Gram positivos	Micrococos en cadena	Colonia multilenticular

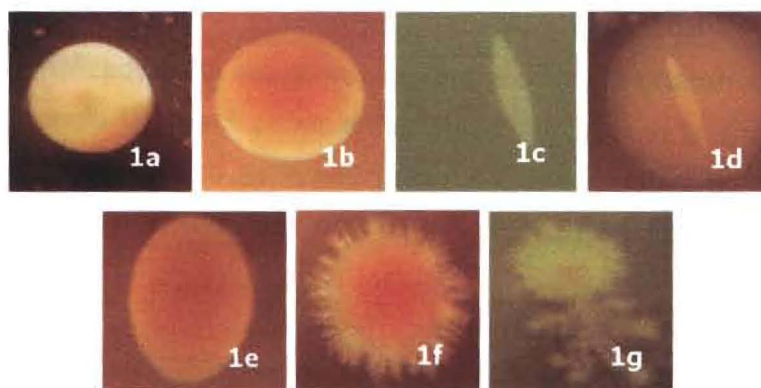


Figura 1. Características de las colonias seleccionadas como *Fibrobacter succinogenes* cultivadas en medio semisólido. 1a: colonia lenticular con perfecta definición en los bordes; 1b lenticular con bordes sinuosos; 1c, lenticular biconvexa; 1d lenticular biconvexa con halo; 1e Elipsoidal; 1f y 1g, formas irregulares.

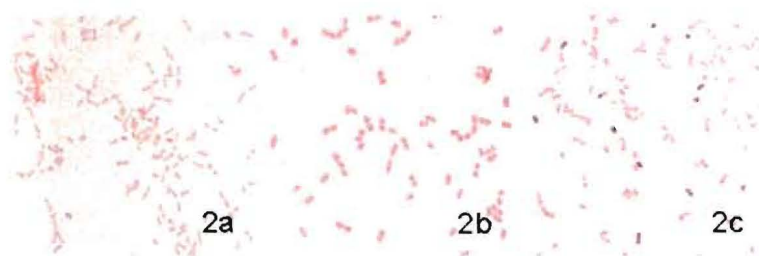


Figura 2. Tinción Gram a las 24, 48 y 72 horas se observa comportamiento Gram variable de las colonias seleccionadas como *Fibrobacter succinogenes* cultivadas en medio líquido.

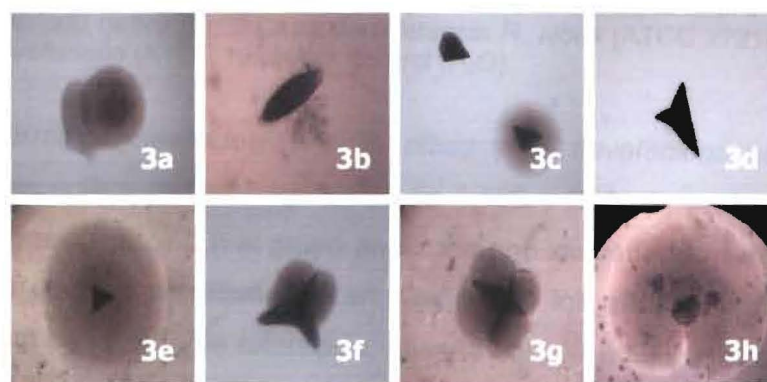


Figura 3. A-B. Morfología de colonias de la cepa de referencia *Ruminococcus albus* ATCC 27210 a 72 horas de crecimiento en agar. C-D. Morfología de colonias de la cepa de referencia *Ruminococcus flavefaciens* ATCC 19208 a 72 horas de crecimiento en agar. E-H. Diversas morfologías de colonias encontradas en las cepas nativas aisladas de ganado criollo BON a 72 horas de crecimiento en agar.